

• 论著 •

miR-708 与慢性乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭患者预后的关系

吴秋萍 吴海丰 黄茂乙 周 云 周贵忠

【摘要】 目的 探究 miR-708 与慢性乙型肝炎 (CHB) 相关慢加急性肝衰竭 (ACLF) 患者预后的关系。**方法** 前瞻性选取 2018 年 3 月至 2020 年 6 月在海南医学院第二附属医院就诊的 128 例 CHB-ACLF 患者 (设为 CHB-ACLF 组) 和 100 例 CHB 患者 (设为 CHB 组) 作为研究对象。根据 CHB-ACLF 患者的预后生存情况将其分为生存组 ($n=66$) 和死亡组 ($n=62$)。采用实时荧光定量 PCR 法检测各组血清 miR-708 的表达水平, 并分析其与 CHB-ACLF 患者预后 90 d 生存情况的关系。**结果** CHB-ACLF 组的血清 miR-708 相对表达量低于 CHB 组 (0.43 ± 0.16 比 0.75 ± 0.14), 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。生存组的血清 miR-708 相对表达量高于死亡组 (0.52 ± 0.14 比 0.33 ± 0.11), 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。多因素 logistic 回归分析结果显示, 国际标准化比值 (INR)、肌酐和终末期肝病模型 (MELD) 评分是 CHB-ACLF 患者预后生存的独立危险因素 ($P < 0.05$), miR-708 是 CHB-ACLF 患者预后生存的独立保护因素 ($P < 0.05$)。miR-708 判断 CHB-ACLF 患者预后生存情况的 ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.864, 敏感度为 79.03%, 特异度为 80.30%。限制性立方样条拟合 logistic 回归分析结果显示, miR-708 与 CHB-ACLF 患者预后生存情况呈线性关系 (非线性检验 $P > 0.05$)。**结论** 检测 CHB-ACLF 患者血清 miR-708 的表达水平有助于判断患者的预后生存情况。

【关键词】 慢性乙型肝炎; 慢加急性肝衰竭; miR-708; 预后

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-534X. 2022. 02. 006

Relationship between miR-708 and prognosis in patients with chronic hepatitis B associated acute-on-chronic liver failure WU Qiuping, WU Haifeng, HUANG Maoyi, ZHOU Yun, ZHOU Guizhong. Department of Tuberculosis, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311, China

【Abstract】 Objective This paper intends to study the relationship between miR-708 and prognosis in patients with chronic hepatitis B (CHB) associated acute-on-chronic liver failure (ACLF). **Methods** A total of 128 patients with CHB-ACLF (CHB-ACLF group) and 100 patients with CHB (CHB group) admitted to the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University from March 2018 to June 2020 were prospectively selected and assigned to the survival group ($n=66$) and the death group ($n=62$) based on the prognosis and survival of CHB-ACLF patients. The expression level of serum miR-708 was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the relationship between miR-708 and the survival prognosis of patients with CHB-ACLF at 90 d was analyzed. **Results** The relative expression level of serum miR-708 in the CHB-ACLF group is lower than that in the CHB group (0.43 ± 0.16 versus 0.75 ± 0.14), with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The relative expression level of serum miR-708 in the survival group is higher than that in the death group (0.52 ± 0.14 versus 0.33 ± 0.11), with a statistically significant difference ($P < 0.05$). Logistic regression analysis shows that the international normalized ratio (INR), creatinine, and the model for end-stage liver disease (MELD) score are independent

risk factors for the prognosis of CHB-ACLF patients ($P < 0.05$), and miR-708 is an independent protective factor for the prognosis of CHB-ACLF patients ($P < 0.05$). The area under the ROC curve (AUC) of miR-708 predicting the prognostic survival of CHB-ACLF patients is 0.864, the sensitivity is 79.03%, and the specificity is 80.30%. Restrictive cubic spline fitting logistic regression analysis shows a linear relationship between miR-708 and the prognosis and survival of patients with CHB-ACLF (nonlinear test $P > 0.05$).

Conclusion Detection of the expression level of serum miR-708 in patients with CHB-ACLF is helpful to understand the prognosis.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Acute-on-chronic liver failure; miR-708; Prognosis

慢加急性肝衰竭 (ACLF) 是指肝脏功能迅速恶化, 同时伴随一个或多个器官衰竭的临床症候群, 患者的短期病死率较高^[1]。在中国, 多数 ACLF 患者在慢性乙型肝炎 (CHB) 的基础上发病^[2]。ACLF 的发病机制较为复杂, 多数患者病情严重, 救治困难^[3]。因此, 早期诊断并了解患者的预后情况有助于提高生存率。目前虽已有多项生物标志物被报道可判断 ACLF 患者的预后情况, 但效能仍不能令人满意, 如部分标志物的敏感度或特异度较低等^[4]。miRNA 是一类由 18~22 个核苷酸组成的单链非编码 RNA, 已被证实可参与 ACLF 的发病和进展过程, 如 miR-223^[5]、miR-125b-5p^[6]、miR-130a^[7] 和 miR-124a^[8] 等。miR-708 已被报道可通过调控蛋白激酶 B (Akt) / 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路表达, 抑制肝脏炎症反应^[9]。此外, miR-708 还可靶向 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路, 抑制肝星状细胞的活化和增殖^[10]。研究表明, Akt/mTOR 信号通路和 Wnt/ β -catenin 信号通路均参与了 ACLF 的发病和进展过程^[11-12]。由此推测, miR-708 可能通过调控上述通路的表达参与 CHB 相关 ACLF (CHB-ACLF) 的发展过程, 其水平或可反映患者的预后情况。目前, 关于 miR-708 是否参与了 ACLF 的发生、发展过程方面鲜有报道。本文探究了 miR-708 与 CHB-ACLF 患者预后生存情况的关系, 以期寻找效能较高的指标用以判断患者的预后。

1 资料与方法

1.1 一般资料

前瞻性选取 2018 年 3 月至 2020 年 6 月在海南医学院第二附属医院就诊的 128 例 CHB-ACLF 患者 (设为 CHB-ACLF 组) 和 100 例 CHB 患者 (设为 CHB 组) 作为研究对象。参照《慢性乙型肝炎防治指南 (2015 更新版)》^[13] 诊断 CHB, 参照《肝衰竭诊治指南 (2012 年版)》^[14] 诊断 ACLF。纳入标准: (1) 确诊为 CHB-ACLF 或 CHB; (2) 表现为

凝血功能障碍 [国际标准化比值 (INR) > 1.5]、黄疸 [总胆红素 (TBiL) $> 85 \mu\text{mol/L}$] 和低蛋白血症; (3) 近 1 个月内有腹水或并发肝性脑病。排除标准: (1) 伴有严重的细菌感染或病毒感染; (2) 伴有自身免疫性疾病, 如炎症性肠病、自身免疫性肝炎等; (3) 伴有恶性肿瘤; (4) 随访失联。CHB-ACLF 组的年龄为 31~67 岁, 平均年龄为 (48.52 ± 7.86) 岁; 其中男性 78 例, 女性 50 例。CHB 组的年龄为 33~68 岁, 平均年龄为 (47.99 ± 6.53) 岁; 其中男性 65 例, 女性 35 例。两组在年龄 ($t = 0.547, P = 0.585$) 和性别 ($\chi^2 = 0.396, P = 0.529$) 方面的差异均无统计学意义, 具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会批准 (批件号 YL018003), 纳入的受试者均签署了知情同意书。

1.2 临床资料

收集所有受试者的年龄、性别、TBiL、INR、肌酐、终末期肝病模型 (MELD) 评分、血小板计数 (PLT) 和白细胞计数 (WBC) 等临床资料。使用全自动生物化学分析仪检测 TBiL 和肌酐水平, 使用 Sysmex XN-3000 型全自动血细胞分析仪检测 PLT 和 WBC, 使用 ACL-TOP 型全自动凝血分析仪检测 INR。于 CHB-ACLF 患者入院 1 周后开始随访, 采用电话随访或住院观察的方式了解患者 90 d 的生存情况, 末次随访时间为 2020 年 9 月 28 日, 将随访过程中患者死亡定义为终点事件。

1.3 miR-708 水平检测

采用实时荧光定量 PCR 法检测各组患者血清 miR-708 的表达水平^[15]。所有患者于入院 24 h 内抽取肘部静脉血 10 mL, 离心后获取上层清液, 置于 -80°C 环境中保存, 待测。采用 TRIzol 法提取血清中总 RNA, 使用反转录试剂盒 (购自日本 TaKaRa 公司) 将 RNA 反转录为 cDNA, 并使用 PCR 仪 (购自美国 Bio-Rad 公司) 扩增 cDNA, 扩增条件为 95°C 预变性 5 min, 之后 95°C 30 s、 59°C 15 s、 72°C 20 s, 共 40 个循环。以 U6 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算

miR-708 的相对表达量。引物由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成, 引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列
miR-708	正向: 5'-GCGGCAAGGAGCTTACAATCTA-3'
	反向: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	正向: 5'-TGCGGGTGCTCGCTTCGCGCAGC-3'
	反向: 5'-GTCGTATCCAGTGCAG-3'

1.4 统计学方法

应用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料以例 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。采用多因素 logistic 回归模型分析影响 CHB-ACLF 患者预后的危险因素。采用 ROC 曲线评价 miR-708 判断 CHB-ACLF 患者预后的效能。采用限制性立方样条拟合 logistic 回归模型分析 miR-708 与 CHB-ACLF 患者预后的关

系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 miR-708 水平比较

CHB-ACLF 组的血清 miR-708 相对表达量为 0.43 ± 0.16 , 低于 CHB 组 (0.75 ± 0.14), 两组的差异有统计学意义 ($t = 16.422$, $P < 0.001$)。CHB-ACLF 组入院后 90 d 的生存率为 51.56% (66/128)。根据 CHB-ACLF 患者的预后生存情况将其分为生存组 ($n = 66$) 和死亡组 ($n = 62$)。生存组的血清 miR-708 相对表达量为 0.52 ± 0.14 , 高于死亡组 (0.33 ± 0.11), 两组的差异有统计学意义 ($t = 8.713$, $P < 0.001$)。

2.2 生存组和死亡组的基本资料比较

生存组和死亡组在年龄、性别方面比较, 差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。生存组的 PLT 水平高于死亡组, 而 TBiL、INR、肌酐、WBC 和 MELD 评分均低于死亡组, 两组的差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 2。

表 2 生存组和死亡组的基本资料比较

项目	生存组 ($n = 66$)	死亡组 ($n = 62$)	统计值	P 值
年龄 / 岁	47.48 ± 7.61	49.63 ± 8.02	$t = 1.552$	0.123
性别 / 例 (%)			$\chi^2 = 0.195$	0.659
男	39 (59.09)	39 (62.90)		
女	27 (40.91)	23 (37.10)		
TBiL/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	279.42 ± 69.41	349.50 ± 99.95	$t = 4.580$	< 0.001
INR	1.78 ± 0.90	2.68 ± 0.65	$t = 6.557$	< 0.001
肌酐/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	69.67 ± 16.98	93.67 ± 18.32	$t = 7.690$	< 0.001
WBC/ $\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$	6.97 ± 2.56	9.02 ± 1.83	$t = 5.246$	< 0.001
PLT/ $\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$	102.91 ± 27.68	81.76 ± 18.79	$t = 5.083$	< 0.001
MELD 评分 / 分	22.42 ± 5.59	28.54 ± 6.22	$t = 5.859$	< 0.001

2.3 影响 CHB-ACLF 患者预后的危险因素

将 CHB-ACLF 组入院 90 d 的生存情况作为因变量, 将 PLT、TBiL、INR、肌酐、WBC、MELD 评分和 miR-708 作为自变量 (均为原始值录入),

纳入多因素 logistic 回归分析, 结果显示 INR、肌酐和 MELD 评分是 CHB-ACLF 患者预后的独立危险因素 ($P < 0.05$), miR-708 是 CHB-ACLF 患者预后的独立保护因素 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 CHB-ACLF 组预后的 logistic 回归分析

项目	β 值	标准误	Wald 值	P 值	OR 值	95%CI
TBiL	0.010	0.005	3.832	0.050	1.010	1.000~1.020
INR	1.240	0.597	4.312	0.038	3.454	1.072~11.129
肌酐	0.090	0.031	8.654	0.003	1.094	1.031~1.162
PLT	-0.022	0.022	0.923	0.337	0.979	0.937~1.023
WBC	0.252	0.210	1.433	0.231	1.286	0.852~1.941
MELD 评分	0.296	0.111	7.115	0.008	1.345	1.082~1.672
miR-708	-4.164	1.296	10.333	0.001	0.016	0.001~0.197

2.4 miR-708 与 CHB-ACLF 患者预后生存的关系

miR-708 判断 CHB-ACLF 患者预后生存的 ROC 曲线下面积 (AUC)、最佳截断值、敏感度和特异度分别为 0.864 (95%CI: 0.802~0.926)、0.39、79.03% 和 80.30%。MELD 评分判断 CHB-ACLF 患者预后生存的 AUC、最佳截断值、敏感度和特异度分别为 0.775 (95%CI: 0.693~0.857)、27 分、62.90% 和 84.85%。结果表明 miR-708 判断 CHB-ACLF 患者预后生存的 AUC 大于 MELD 评分, 但两者的差异无统计学意义 ($Z=1.680$, $P=0.093$), 见图 1A。采

用限制性立方样条拟合多因素 logistic 回归模型分析 miR-708 与 CHB-ACLF 患者预后生存的关系, 结果显示当节点个数为 3 时, AIC 值最小 ($AIC=122.218$), 这提示 miR-708 与 CHB-ACLF 患者的预后生存有关 ($\chi^2=32.20$, $P<0.001$), 且呈线性关系 (非线性检验 $\chi^2=1.07$, $P=0.300$)。以 miR-708 判断 CHB-ACLF 患者预后生存的最佳截断值作为分界点, 当 $miR-708<0.39$ 时, CHB-ACLF 患者预后发生死亡的风险升高; 当 $miR-708>0.39$ 时, CHB-ACLF 患者预后发生死亡的风险降低, 见图 1B。

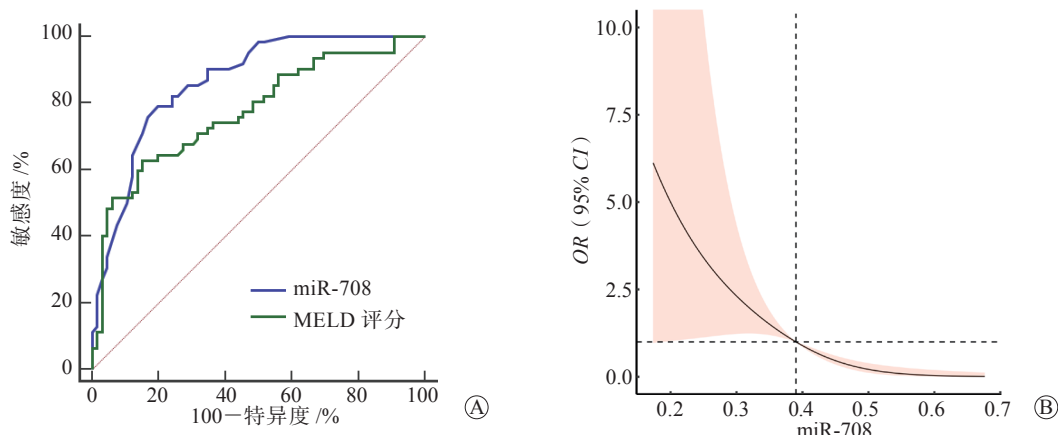


图 1 miR-708 与 CHB-ACLF 患者预后生存的关系 A miR-708 和 MELD 评分判断 CHB-ACLF 患者预后生存的 ROC 曲线 B miR-708 与 CHB-ACLF 患者预后生存的限制性立方样条图

3 讨论

目前已被应用于 ACLF 预后评估的生物标志物主要包括与免疫反应、炎症反应、氧化应激相关的标志物, 以及基因组学标志物等, 但由于 ACLF 的诱因、发病机制、临床干预措施等的多样性及个体化差异, 各项标志物仍存在一定的局限性^[16]。因此, 探寻能够准确判断 ACLF 患者预后情况的生物标志物具有重要意义。

本研究结果显示, CHB-ACLF 组的血清 miR-708 相对表达量低于 CHB 组, 这提示 miR-708 可能参与了 CHB 进展为 ACLF 的过程。本研究结果还显示, CHB-ACLF 患者中生存组的血清 miR-708 相对表达量高于死亡组, 这提示 miR-708 可能参与了 ACLF 的发展过程, 其水平或可反映患者的预后情况。为避免混杂因素影响分析结果, 本研究将可能与 CHB-ACLF 患者预后生存相关的因素纳入多因素 logistic 回归模型, 分析结果显示 miR-708 是 CHB-ACLF 患者预后的独立保护因素。有研究表明,

miR-708 不仅可靶向 Akt/mTOR 信号通路抑制肝脏炎症反应, 还可靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制肝星状细胞的活化和增殖^[9-10]。此外, Akt/mTOR 信号通路与人肝星状细胞内炎症因子的表达有关^[11], Wnt/ β -catenin 信号通路的药理学刺激可抑制硫代乙酰胺诱导的急性肝衰竭进程^[12]。由此推测, miR-708 的表达水平与肝脏炎症反应和纤维化程度密切相关, 可反映 CHB-ACLF 患者的预后情况。此外, 本研究结果还显示 INR、肌酐和 MELD 评分是 CHB-ACLF 患者预后的独立危险因素, 这与已报道的研究结论相符^[17-18]。

本研究构建了 miR-708 判断 CHB-ACLF 患者预后生存的 ROC 曲线, 结果显示 miR-708 判断 CHB-ACLF 患者预后生存的 AUC、敏感度和特异度分别为 0.864、79.03% 和 80.30%, 其诊断效能优于 MELD 评分, 可辅助用于 CHB-ACLF 的预后判断。此外, 限制性立方样条拟合多因素 logistic 回归分析结果显示, miR-708 与 CHB-ACLF 患者的预后呈

线性关系,且低水平的 miR-708 提示 CHB-ACLF 患者预后发生死亡的风险增高。

综上所述,检测 CHB-ACLF 患者血清 miR-708 的表达水平有助于判断患者的预后生存情况。本研究尚存在不足之处,比如为单中心研究,纳入的样本量有限,尚不能完全排除地域、个体化差异等因素对分析结果的影响;且本研究未开展基础实验分析 miR-708 是否可通过靶向 Akt/mTOR 和 Wnt/ β -catenin 信号通路参与 CHB-ACLF 的进展过程。今后课题组将针对以上不足之处,进一步探究 miR-708 影响 CHB-ACLF 患者预后的病理、生理学机制。

参 考 文 献

- 1 Arroyo V, Moreau R, Jalan R. Acute-on-chronic liver failure[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(22): 2137-2145.
- 2 俞旭东, 钱永兵, 夏强, 等. 慢加急性肝衰竭的研究进展 [J]. *国际消化病杂志*, 2019, 39(4): 252-255, 280.
- 3 Arroyo V, Jalan R. Acute-on-chronic liver failure: definition, diagnosis, and clinical characteristics[J]. *Semin Liver Dis*, 2016, 36(2): 109-116.
- 4 Zhao R, Wu W, Zhou Z, et al. Prognostic utility of novel biomarkers in acute-on-chronic liver failure (ACLF) associated with hepatitis B: A multicenter prospective study[J]. *Hepatol Res*, 2019, 49(1): 42-50.
- 5 Schueller F, Roy S, Loosen SH, et al. MiR-223 represents a biomarker in acute and chronic liver injury[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(15): 1971-1987.
- 6 Tao YC, Wang ML, Wang M, et al. Quantification of circulating miR-125b-5p predicts survival in chronic hepatitis B patients with acute-on-chronic liver failure[J]. *Dig Liver Dis*, 2019, 51(3): 412-418.
- 7 Zheng QF, Zhang JY, Wu JS, et al. Upregulation of miRNA-130a represents good prognosis in patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure: a prospective study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(6): e2639.
- 8 Wang X, Xu H, Wang Y, et al. MicroRNA-124a contributes to glucocorticoid resistance in acute-on-chronic liver failure by negatively regulating glucocorticoid receptor alpha[J]. *Ann Hepatol*, 2020, 19(2): 214-221.
- 9 Hu S, Liu YM, Chen-Chen, et al. MicroRNA-708 prevents ethanol-induced hepatic lipid accumulation and inflammatory reaction via direct targeting ZEB1[J]. *Life Sci*, 2020, 258: 118147.
- 10 Yang J, Tao Q, Zhou Y, et al. MicroRNA-708 represses hepatic stellate cells activation and proliferation by targeting ZEB1 through Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 871: 172927.
- 11 Wang H, Zhang H, Zhang Y, et al. Plumbagin protects liver against fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis via inhibiting inflammation and collagen production[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 82864-82875.
- 12 Kobliňová E, Mrázová I, Vaňourková Z, et al. Pharmacological stimulation of Wnt/beta-catenin signaling pathway attenuates the course of thioacetamide-induced acute liver failure[J]. *Physiol Res*, 2020, 69(1): 113-126.
- 13 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 (2015 更新版) [J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(12): 888-905.
- 14 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南 (2012 年版) [J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(3): 177-183.
- 15 Baghdadi MB, Firmino J, Soni K, et al. Notch-induced miR-708 antagonizes satellite cell migration and maintains quiescence[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 859-868. e5.
- 16 张玉玲, 韩涛, 张敏, 等. 慢加急性肝衰竭预后标志物的研究进展 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(10): 1078-1081.
- 17 李晨, 吕飒, 朱冰, 等. 乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭患者近期预后危险因素的研究 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2016, 24(3): 207-213.
- 18 李艳艳, 徐龙. 血清前白蛋白与总胆红素比值、ALBI 评分、MELD 评分与慢加急性肝衰竭患者预后的关系 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2020, 30(5): 417-419.

(收稿日期 : 2021-01-07)

(本文编辑 : 周骏)